

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 25/02/2023.

EFEITO DA ALTITUDE NA DIVERSIDADE QUÍMICA E GENÉTICA DE *Lychnophora pinaster* Mart.

ROBERTO DE OLIVEIRA PORTELLA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas (Botânica).
Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica
Vegetal

BOTUCATU-SP

-2021-

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITO DA ALTITUDE NA DIVERSIDADE QUÍMICA E
GENÉTICA DE *Lychnophora pinaster* Mart.

ROBERTO DE OLIVEIRA PORTELLA

PROFA. DRA. MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES

(Orientador)

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Botânica). Área de
concentração: Fisiologia e Bioquímica Vegetal

BOTUCATU-SP

-2021-

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Portella, Roberto de Oliveira.

Efeito da altitude na diversidade química e genética de
Lychnophora pinaster Mart / Roberto de Oliveira Portella.
- Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Marcia Ortiz Mayo Marques

Capes: 20303009

1. Biologia computacional. 2. Genética de populações.
3. Cerrados. 4. Óleos essenciais. 5. Sesquiterpenos.

Palavras-chave: Bioinformática; Cerrado; Genética de
populações; Óleos essenciais; Sesquiterpenos.

“Minha querida, você ri e não eu, se sabe quão bizarro é assunto que me traz aqui. Aprendi não depreciar a crença dos outros, por mais peculiar que pode ser. Tento manter a cabeça aberta, porque não são coisas corriqueiras da vida que podem fechar, mas coisas insólitas, extraordinários, que fazem duvidar da própria sanidade.”

Drácula, Bram Stoker, 1897.

Dedico à minha família e aos meus amigos

Agradecimentos

Dedico ao Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processos 2017/24927-7 e 2020/01064-6) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento fornecido para desenvolvimento desta tese e de demais projetos;

Dedico a todas as pessoas do Instituto Agrônomo (IAC), do Departamento de Genética da Universidade de Campinas (Unicamp), do Colégio de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (Esalq/USP), da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), do Departamento de Bioestatística, Biologia Vegetal, Parasitologia e Zoologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e da Universidade de Taubaté (UNITAU); pois sem a ajuda e o comprometimento dessas pessoas, a confecção de minha tese não seria uma realidade;

Dedico a minha família e aos meus amigos pelo suporte, apoio, conversas agradáveis, conselhos e avisos desde meu início de carreira até hoje;

Dedico a minha esposa Karin, pelo compenheirismo nesses últimos doze anos, pela confiança que você sempre teve em mim, pelo apoio nos momentos mais difíceis da minha vida e por acreditar que eu poderia chegar ao fim dessa jornada; e

Dedico a minha orientadora, a Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques pela confiança depositada em mim, por mostrar que eu seria capaz conduzir meus projetos a seu lado e por me guiar e acreditar em mim nesses últimos dez anos de parceria.

Sumário

Resumo	13
Abstract	14
I - Introdução	15
II - Objetivos.....	26
III - Material e Métodos	27
IV - Resultados	40
V - Discussão	69
VI – Conclusão	74
VII - Considerações Finais	75
VIII - Referencial Bibliográfico.....	76
IX – Anexos	88

Lista de Tabelas

Tabela 1. Populações de <i>Lychnophora pinaster</i> , Minas Gerais, Brasil.	27
Tabela 2. Composição química média (%) dos óleos essenciais de populações de <i>L. pinaster</i> , Minas Gerais, Brasil.	43
Tabela 3. Média dos valores dos fatores climáticos das populações de <i>L. pinaster</i> localizadas nas regiões Norte e metropolitana de Belo Horizonte (MrBH), Minas Gerais, Brasil.	46
Tabela 4. Valores de correlação de cada componente principal.....	46
Tabela 5. Diversidade genética das populações de <i>L. pinaster</i> , Minas Gerais, Brasil.	56
Tabela 6. Matriz de distâncias geográficas (km) entre as populações de <i>Lychnophora pinaster</i> Minas Gerais, Brasil.	67
Tabela 7. Dados espectrais de RMN de ^1H (300 MHz), ^{13}C e DEPT (75 MHz) em CDCl_3 do sesquiterpeno com índice de retenção de 1506 isolado das folhas de <i>Lychnophora pinaster</i> , população da Serra da Moeda, MG, Brasil).	88
Tabela 8. Dados espectrais de RMN 2D (HSQC e HMBC) do sesquiterpeno com índice de retenção de 1504 isolado das folhas de <i>Lychnophora pinaster</i> , população da Serra da Moeda, MG, Brasil.	89

Lista de Figuras

Figura 1. Localização geográfica das populações de *Lychnophora pinaster* Mart. no estado de Minas Gerais, Brasil.28

Figura 2. Fluxograma dos métodos desenvolvidos.29

Figura 3. Rendimento de produção dos óleos essenciais de *Lychnophora pinaster* Mart. Os valores do rendimento de extração foram submetidos a análise *Kruskal-Wallis* ($p=1,6.10^{-11}$). As letras minúsculas representam as múltiplas comparações expressas pelo teste de Dunn ($p>0,05$) com correção de Bonferroni. Os pontos em cada boxplot indicam o número e distribuição dos indivíduos de cada população. Diamantina (DI, $0,05 \pm 0,02$, $n=17$); Grão-Mogol (GM, $0,05 \pm 0,02$, $n=24$); Olhos D'Água (ODMa, $0,18 \pm 0,11$, $n=16$); Raposos (RPS, $0,22 \pm 0,04$, $n=14$); Serra da Moeda (SM, $0,11 \pm 0,05$, $n=19$); e Serra do Rola-Moça (SRM, $0,08 \pm 0,08$, $n=19$).40

Figura 4. Análise de correlação entre as altitudes (m) e o rendimento de produção dos óleos essenciais (%) de cada indivíduo das populações de *Lychnophora pinaster* Mart. Correlação de *Kendall* ($R=-0,02640$ e $p=-0.6866$).41

Figura 5. Análise de componentes principais da composição química dos óleos essenciais de *L. pinaster* frente os fatores climáticos. a.tuj.m.: α -tujeno; a.pin.m.: α -pineno; X4Z.Hepten.ac.: 4Z-Hepten-1-ol; etilmetilpent.fp.: etil-3-metil pentanoato; sab.m.: sabineno; b.pin.m.: β -pineno; oxlinalool.mo.: óxido de dehidróxi-*trans*-linalol; o.cim.m.: *o*-cimeno; lim.m.: limoneno; X1.8.cin.mo.: 1,8-cineol; terp.m.: terpineno; terpinol.m.: terpinoleno; linalo.mo.: linalol; n.non.al.: *n*-nonanal; trans.pino.mo.: *trans*-pinocarveol; iso.3.tuj.mo.: *iso*-3-tujanol; pinocarv.co.: pinocarvona; terpinen.4.mo.: terpinen-4-ol; a.terpin.mo.: α -terpineol; mirt.mo.: mirtenol; mirtal.al.: mirtenal; n.dec.al.: *n*-decanal; trans.acpinoc.fp.: acetado de *trans*-pinocarvila; undec.al.: undecanal; cis.acpin.fp.: acetato de *cis*-pinocarvila; acger.m.: acetato de geranil; b.elem.s.: β -elemeno; a.cip.s.: α -cipereno; cis.car.s.: *cis*-cariofileno; trans.car.s.: *trans*-cariofileno; b.farn.s.: β -farneseno; a.hum.s.: α -humuleno; cumac.s.: cumacreno; tridec.al.: tridecanal; X4.oxo.15.nor.so.: 4-oxo-15-nor-eudesman-11-eno; Z.ner.so.: *Z*-nerolidol; sesqui03: sesquiterpeno 1; a.copaen.ol.so.: α -copaen-11-ol; decane.ac.: 1,10-decanediol; epi.long.so.: epi-longipinanol; spat.so.: espatulenol; carox..so.: óxido de cariofileno; b.copaen.ol.so.: β -copaen-4 α -ol; vir.so.: viridiflorol; trans.carp.fp.: *trans*-carpacina; sesqui04: sesquiterpeno 2; sesqui06: sesquiterpeno 3; allo.cedren.so.: *allo*-epóxido de aromadendreno; selina.ol.cedr.so.: cedr-8(15)-en-9- α -ol; X14.trans.car.so.: 14-hidróxi-(*Z*)-cariofileno; X14.epi.car.so.: 14-hidroxi-9-*epi*-(*E*)-cariofileno; germ.so.: germacrona; eudesm.ol.so.: eudesm-7(11)-en-4-ol; acetridec.ac.: acetato de (2*E*)-tridecenol; X14.a.hum.so.: 14-hidróxi- α -humuleno; X14.hid.dihidro.cari.so.: 14-hidróxi-4,5-dihidro-cariofileno; benzibenz..fp.: benzoato de benzila; curcumen.so.: γ -curcumen-15-al; sesqui7: sesquiterpeno 4; acetoxi.hum..so.: 14-acetóxi- α -humuleno; alt: altitude; cld: cobertura de nuvens; dtr: variação de temperatura diária; pet: potencial de evapotranspiração; pre: precipitação; tmn: temperatura mínima; tmp: temperatura média; tmx: temperatura máxima; vap: pressão de vapor; wet: umidade relativa diária; yield: rendimento dos óleos essenciais..49

Figura 6. Análise hierárquica de Cluster (AHC) das populações de *L. pinaster*. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; RPS: Raposos; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça. A AHC foi realizada com Distância Euclideana e enlace de Ward.52

Figura 7. Análise de heatmap da composição química dos óleos essenciais de *L. pinaster* frente aos fatores climáticos. a.tuj.m.: α -tujeno; a.pin.m.: α -pineno; X4Z.Hepten.ac.: 4Z-Hepten-1-ol; etilmetilpent.fp.: etil-3-metil pentanoato; sab.m.: sabineno; b.pin.m.: β -pineno; oxlinalool.mo.: óxido de dehidróxi-*trans*-linalol; o.cim.m.: *o*-cimeno; lim.m.: limoneno; X1.8.cin.mo.: 1,8-cineol; terp.m.: terpineno; terpinol.m.: terpinoleno; linalo.mo.: linalol; n.non.al.: *n*-nonanal; trans.pino.mo.: *trans*-pinocarveol; iso.3.tuj.mo.: *iso*-3-tujanol; pinocarv.co.: pinocarvona; terpinen.4.mo.: terpinen-4-ol; a.terpin.mo.: α -terpineol; mirt.mo.: mirtenol; mirtal.al.: mirtenal; n.dec.al.: *n*-decanal; trans.acpinoc.fp.: acetado de *trans*-pinocarvila; undec.al.: undecanal; cis.acpin.fp.: acetato de *cis*-pinocarvila; acger.m.: acetato de geranil; b.elem.s.: β -elemeno; a.cip.s.: α -cipereno; cis.car.s.: *cis*-cariofileno; trans.car.s.: *trans*-cariofileno; b.farn.s.: β -farneseno; a.hum.s.: α -humuleno; cumac.s.: cumacreno; tridec.al.: tridecanal; X4.oxo.15.nor.so.: 4-oxo-15-nor-eudesman-11-eno; Z.ner.so.: Z-nerolidol; sesqui03: sesquiterpeno 1; a.copaen.ol.so.: α -copaen-11-ol; decane.ac.: 1,10-decanediol; epi.long.so.: epi-longipinanol; spat.so.: espatulenol; carox..so.: óxido de cariofileno; b.copaen.ol..so.: β -copaen-4 α -ol; vir.so.: viridiflorol; trans.carp.fp.: *trans*-carpacina; sesqui04: sesquiterpeno 2; sesqui06: sesquiterpeno 3; allo.cedren.so.: *allo*-epóxido de aromadendreno; selina.ol.cedr.so.: cedr-8(15)-en-9- α -ol; X14.trans.car.so.: 14-hidróxi-(Z)-cariofileno; X14.epi.car.so.: 14-hidroxi-9-*epi*-(*E*)-cariofileno; germ.so.: germacrona; eudesm.ol.so.: eudesm-7(11)-en-4-ol; acetridec.ac.: acetato de (2*E*)-tridecenol; X14.a.hum.so.: 14-hidróxi- α -humuleno; X14.hid.dihidro.cari.so.: 14-hidróxi-4,5-dihidro-cariofileno; benzibenz..fp.: benzoato de benzila; curcumen.so.: γ -curcumen-15-al; sesqui7: sesquiterpeno 4; acetoxi.hum..so.: 14-acetóxi- α -humuleno; alt: altitude; cld: cobertura de nuvens; dtr: variação de temperatura diária; pet: potencial de evapotranspiração; pre: precipitação; tmn: temperatura mínima; tmp: temperatura média; tmx: temperatura máxima; vap: pressão de vapor; wet: umidade relativa diária; yield: rendimento dos óleos essenciais; alt: altitude; cld: cobertura de nuvens; dtr: variação de temperatura diária; pet: potencial de evapotranspiração; pre: precipitação; tmn: temperatura mínima; tmp: temperatura média; tmx: temperatura máxima; vap: pressão de vapor; wet: umidade relativa diária. 53

Figura 8. Dendograma e heatmap da expressão da divergência populacional de *L. pinaster* baseada no índice de fixação (F_{ST}) de Wright. O índice de fixação foi baseado no set completo de marcadores SNP entre as populações de *L. pinaster*. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto. 57

Figura 9. Análise de erro por validação cruzada (*cross-validation*) que descreve o melhor valor de K para a estruturação das populações de *L. pinaster* estudadas. 58

Figura 10. Estrutura populacional de *L. pinaster* segundo a estimativa dos valores de K por validação cruzada. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto. 59

Figura 11. Distribuição dos loci com marcadores SNP segundo o modelo BayeScan expressos de acordo com os índices de fixação (F_{ST}). Os pontos cinzas indicam loci sob seleção neutra; os pontos azuis indicam os loci sob seleção balanceadora; e os pontos amarelos indicam loci sob seleção positiva. 60

Figura 12. Análise de erro por validação cruzada (*cross-validation*) que descreve o melhor valor de K para a clusterização das populações de *L. pinaster* estudadas para o set neutro de SNPs. 61

Figura 13. Análise da estrutura populacional de *L. pinaster* de acordo com o set neutro de marcadores SNP selecionados pelo método BayeScan. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto.61

Figura 14. Análise de componentes principais (ACP) baseada no set neutro de marcadores SNP selecionados pelo método BayeScan. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto.62

Figura 15. Análise da estrutura populacional de *L. pinaster* de acordo com o set positivo de marcadores SNP selecionados pelo método BayeScan. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto.63

Figura 16. Análise de componentes principais (ACP) baseada no set neutro de marcadores SNP selecionados pelo método BayeScan. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto.64

Figura 17. Análise de componentes principais (A) baseada na seleção de marcadores SNP segundo o modelo PCAdapt. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto. B: plot Manhattan; C: plot dos valores de Q-Q; D: plot dos valores de p ($p < 0,5 \times 10^{-3}$).66

Figura 18. Estrutura química do sesquiterpeno 4-oxo-15-nor-eudesmano-11-eno isolado no óleo essencial da população Serra da Moeda com índice de retenção linear de 1504 (IRL calc)89

Lista de Abreviaturas

CG: cromatógrafo a gás

EM: espectrômetro de massas

CG-EM: cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas

CG-DIC: cromatógrafo a gás com detector de ionização de chamas

IRL: Índice de retenção linear

ACP Análise de Componentes Principais

AHC: Análise Hierárquica de Cluster

NGS: Sequenciamento de próxima geração ou *Next-generation Sequencing*

GBS: *genotyping-by-sequencing*

SNP: Nucleotídeo de polimorfismo único

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

ODMa: população de Olhos D'Água

DI: População de Diamantina

GM: População de Grão-Mogol

SRM: População da Serra do Rola-Moça

SM: População de Serra da Moeda

RPS: População de Raposos

SA: População de Serra da Arnica

SB: População de Serra Branca

SSa: População de Serra do Salto

MrBH: Região metropolitana de Belo Horizonte

CV: Campos das Vertentes

π : diversidade nucleotídica

Ho: Heterozigosidade observada

He: Heterozigosidade esperada

A_p: Alelos privados

P: Frequência alélica dos alelos mais frequentes por locus

F_{IS}: Coeficiente de endogamia intrapopulacional

F_{ST}: coeficiente de fixação

Resumo

Lychnophora pinaster Mart. (Asteraceae) é considerada uma espécie endêmica do Cerrado, utilizada na medicina tradicional e distribuída no gradiente de altitude das serras do estado de Minas Gerais. Essas variações de altitude das serras podem modificar os fatores climáticos que moldam os padrões de isolamento geográfico entre as populações e atuam como fatores na seleção natural, interferindo na diversidade genética e na diversidade da composição química dos óleos essenciais de espécies endêmicas. Diante do trecho descrito anteriormente, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da altitude na diversidade genética e na composição química de óleos essenciais de populações de *L. pinaster* encontradas em diferentes altitudes. Indivíduos de *Lychnophora pinaster* de cinco populações de duas regiões do estado de Minas Gerais (Norte e Região metropolitana de Belo Horizonte) tiveram seus óleos essenciais analisados, e indivíduos de oito populações encontrados em três regiões (Norte; Região metropolitana de Belo Horizonte; e Campo das Vertentes) tiveram seus dados genômicos analisados por marcadores SNP. Os principais resultados indicaram que as populações de *L. pinaster* apresentam elevada diversidade genética e química. Os compostos majoritários nos óleos essenciais foram 14-hidróxi- α -humuleno (GM e DI), cedr-8(15)-en-9- α -ol (ODMa), 14-acetoxi- α -humuleno (SRM) e 4-oxo-15-nor-eudesman-11-eno (SM). Além disso, cada população apresenta uma composição química distinta de óleos essenciais, fortemente determinada por diferentes fatores climáticos. Altitudes elevadas (1366 m e 1498 m) encontradas na Região metropolitana de Belo Horizonte sofrem com os efeitos da precipitação e da amplitude térmica diurna, expressos na composição química dos óleos essenciais, e as populações encontradas em baixas altitudes (<900 m) são fortemente influenciadas por temperaturas máximas e mínimas e umidade relativa. Os dados genéticos indicam que as populações de *L. pinaster* apresentam segregação espacial alélica, determinada pelas serras de Minas Gerais, de forma que as faixas de altitude determinaram a diversidade genética de *L. pinaster*.

Palavras-chave: arnica, óleos essenciais, sesquiterpenos, genética de populações, Cerrado

Abstract

Lychnophora pinaster Mart. (Asteraceae) is considered a species endemic to the Cerrado, used in traditional medicine and distributed in the altitude gradient of the mountains of the state of Minas Gerais. Altitudinal variations modify the abiotic factors that shape the patterns of geographic isolation among populations and act as important factors in natural selection, interfering in the genetic diversity and the diversity of the chemical composition of endemic species. Because of the stretch described above, the objective of this study was to evaluate the influence of altitude on the genetic diversity and chemical composition of essential oils from *L. pinaster* populations found at different altitudes. Individuals of *Lychnophora pinaster* from five populations in two regions of the state of Minas Gerais (North and Metropolitan region of Belo Horizonte) had their essential oils analyzed, and individuals from eight populations found in three regions (North; Metropolitan region of Belo Horizonte; and Campo das Vertentes) had their genomic data analyzed by SNP markers. The main results indicated that *L. pinaster* populations have high genetic and chemical diversity. The major compounds in the essential oil were 14-hydroxy- α -humulene (GM and DI), cedr-8 (15)-en-9- α -ol (ODMa), 14-acetoxy- α -humulene (SRM), and 4-oxo-15-nor-eudesman-11-ene (SM). Furthermore, each population has a different chemical composition of essential oils, strongly determined by different abiotic factors. High altitudes (1366 m and 1498 m) found in the Metropolitan region of Belo Horizonte have suffered with higher precipitation and daytime thermal amplitude on the chemical composition of essential oils, and populations found at lower altitudes (<900 m) are strongly influenced by maximum and minimum temperatures and relative humidity. The genetic data indicate that the populations of *L. pinaster* show allelic spatial segregation, determined by the different altitudinal patterns of Minas Gerais, and altitudinal ranges of the mountains of Minas Gerais determine the genetic diversity of *L. pinaster* populations.

Keywords: arnica, essential oils, sesquiterpenes, genetics of populations, Cerrado

I - Introdução

1. Metabolismo especializado frente a altitude

A altitude atua no controle e nos padrões de diversos fatores climáticos, como por exemplo na alteração dos níveis de precipitação, na amplitude térmica diária, na qualidade e composição química do solo, na velocidade dos ventos, na pressão atmosférica, na condição da cobertura de nuvens e na intensidade de radiação (KÖRNER, 1999; ZIDORN, 2010), fatores os quais em conjunto podem alterar os aspectos morfológicos, fisiológicos, e genéticos das plantas (ANGIONI et al., 2004; RUSSELLO et al., 2015; MEENA et al., 2016; FILATOV et al., 2016; MELITO et al., 2016; SILVA, 2016; CIRAK et al., 2017). Em resposta aos fatores climáticos, as plantas sofrem ajustes moleculares e metabólicos cuja finalidade é a de evitar, tolerar ou até mesmo resistir aos fatores climáticos (SOUZA & LÜTTGE, 2015), culminando com a possibilidade de evolução química e molecular nas plantas. O metabolismo especializado das plantas sofre constantes efeitos dos fatores climáticos provocados pelo gradiente de altitude, conduzindo a diferentes alterações nos perfis químicos das espécies (ANGIONI et al., 2004; DE et al., 2015; CIRAK et al., 2017).

Populações de *Matricaria chamomilla* L., localizada em gradiente altitudinal de 590 m até 2230 m na Austrália, apresentam composição química distinta, de forma que as populações localizadas em altas altitudes apresentam perfil químico distinto das populações que crescem em baixas altitudes (GANZERA et al., 2008). Os autores ainda afirmam que há aumento de 26% na produção de flavonoides e 31% de fenóis em indivíduos localizados entre 1000m e 2000m de altitude, mostrando que flavonoides e fenóis aumentam significativamente seus teores conforme o aumento da altitude.

Extratos etanólicos de populações de *Marchantia polymorpha* L. localizadas em diferentes altitudes na Índia a oeste do Himalaia, com variação altitudinal de 5800 m a 8202 m, têm suas atividades antibacteriana e antioxidante mais pronunciadas em plantas coletadas em elevadas altitudes (DE et al., 2015). Os autores acreditam que elevadas altitudes apresentam fatores

climáticos distintos os quais contribuem para alterar o pool de metabólitos especializados da espécie analisada ao longo da faixa altitudinal.

Hypericum androsaemum L. encontrada em variações altitudinais de 113 m a 1161 m e *Hypericum polyphyllum* Boiss. & Bal. encontrada em variações de altitude entre 500 m e 3250 m na Turquia mostra que *H. androsaemum* apresentou correlação positiva entre a produção de ácido clorogênico, ácido neoclorogênico, amentoflavona, hiperocida, isoquecitrina, quecitrina e quercetina com o aumento da altitude e *H. polyphyllum* apresentou correlação positiva entre a produção de hipericina, pseudohipericina, ácido clorogênico, amentoflavona, isoquecitrina, quecitrina, rutina e quercetina com o aumento da altitude (CIRAK et al., 2017). Os autores acreditam que as baixas temperaturas e alta exposição solar encontradas nas regiões de elevadas altitudes podem ajustar a produção de metabólitos não-voláteis nessas espécies, a fim de promover defesas antioxidantes contra o excesso de luminosidade.

Dentre as diversas vias de biossíntese de metabólitos especializados nas plantas, as vias de biossíntese dos óleos essenciais são excelentes alvos de estudo pois sofrem constantemente com as variações ambientais (LORETO & SCHNITZLER, 2010). Óleos essenciais são definidos pela *Internacional Organization for Standardization* (ISO) como "...produtos obtidos a partir de matérias primas naturais de origem vegetal por destilação a vapor, por destilação a seco, ou pelo uso de processos mecânicos para o epicarpo de frutos cítricos, após a separação da fase aquosa (se houver), por processos físicos." (ISO, 2013). Os óleos essenciais geralmente apresentam caráter hidrofóbico, com baixa solubilidade em contato com a água e alta solubilidade em contato com solventes orgânicos apolares (SINGH et al., 2002; SIMÕES, 2007; LOBO et al., 2009).

Sabe-se que o metabolismo dos óleos essenciais produz inúmeras substâncias químicas necessárias à sobrevivência das plantas. Aponta-se que os fatores bióticos e abióticos são capazes de provocar oscilações metabólicas as quais são identificadas nas alterações dos perfis químicos desses óleos essenciais (ANGIONI et al., 2004; SIMÕES, 2007; LOBO et al., 2009;

PORTELLA et al., 2014; De ALMEIDA et al., 2016). Alguns fatores climáticos alteram substancialmente a composição química das plantas, como por exemplo a precipitação, temperatura, sazonalidade (PORTELLA et al., 2014; De ALMEIDA et al., 2016), as condições de solo e geológicas da região (SORO et al., 2016; YAHIA et al., 2019) e a variação na altitude (CHAUHAN et al., 2016; MELITO et al., 2016), contribuindo com o estabelecimento da espécie no ambiente.

Populações de *Rosmarinus officinalis* L. localizadas desde ao nível do mar até 1000 m de altitude na Itália apresentam variação na composição química dos óleos essenciais, cujas substâncias β -cariofileno, verbeneno, humuleno, α -terpineol, acetato de bornila e terpinoleno oscilam nas 17 estações naturais e também em quatro regiões distintas, Norte, Sul, Leste e Oeste do país (ANGIONI et al., 2004). Segundo MELITO et al (2016), populações de *Helichrysum italicum* G. Don f. encontradas ao nível do mar e em faixas de altitude entre 600 m e 1250 m apresentaram alterações na produção de substâncias dos óleos essenciais, de forma que italiceno, γ -curcumeno, ar-curcumeno, nerol e geraniol apresentaram correlações positivas entre seus altos teores e elevadas altitudes, enquanto limoneno, cariofileno nerolidol e cis- β -guaieno apresentaram correlações negativas entre seus altos teores e elevadas altitudes.

É evidente que a variação da altitude modula o metabolismo especializado das plantas, contribuindo com a variação na diversidade química das espécies. Uma espécie que ocorre em diferentes altitudes deve ser investigada, uma vez que a altitude promoveria ajustes metabólicos nos indivíduos de diferentes populações. Ainda mais, algumas populações poderiam apresentar menor comunicação entre elas, fato que poderá ser amostrado na diversidade química populacional. Contudo, a diversidade química populacional não é relacionada somente com a variação de altitude, mas também com sua diversidade e estrutura genéticas. Ao investigarmos a diversidade química das espécies, devemos concomitantemente investigar a diversidade genética dessas mesmas populações.

2. Ação da altitude na diversidade e na estrutura populacional

Considera-se que múltiplos fatores regulam a diversidade genética das populações. Em especial, as taxas de migração, o aparecimento de mutações e a seleção natural regulam a dinâmica populacional nos ambientes naturais (ALLENDORF et al., 2013; SILVA, 2016). É esperado que a diversidade genética de populações acompanhe o equilíbrio de Hardy-Weinberg (MEIRMANS, 2019), mantendo a variabilidade genética da espécie através do equilíbrio das frequências alélicas e genotípicas, pelo fluxo gênico existente entre as populações e pela manutenção de heterozigotos, mantendo a variabilidade genética da espécie (SÁNCHEZ, 2008; ALLENDORF, 2013). Contudo, em populações naturais as quais sofrem com os efeitos bióticos e abióticos, com a seleção natural e com eventos mutacionais, é observado quedas no fluxo gênico entre as populações, resultando no isolamento espacial de alelos e genótipos intra e interpopulacional, comprometendo a presença de heterozigotos nas populações (SÁNCHEZ, 2008; ALLENDORF, 2013; SILVA, 2016).

Sabe-se que espécies endêmicas ocorrem somente em um determinado local (ECHTERNACHT et al., 2011; ALLENDORF, 2013), sendo fortemente selecionadas por fatores climáticos. A ação dos fatores climáticos pode causar o isolamento interpopulacional, contribuindo com a perda de variabilidade genética e aumento da divergência entre as populações, alterando a diversidade genética dessa espécie (SILVA, 2006; HABER, 2008; SILVA, 2016). Populações ficam isoladas pela ação de diferentes fatores, como por exemplo a variação de altitude (ECHTERNACHT et al., 2011; ALLENDORF, 2013). A altitude interfere na diversidade genética de várias espécies (LI et al., 2013; RUSSELLO et al., 2015; MEENA et al., 2016; FILATOV et al., 2016). Conforme apontado pelos pesquisadores, a variação de altitude provoca quedas no fluxo gênico, quedas na heterozigosidade interpopulacional, aumento no número de alelos privados entre as populações e aumento da variabilidade genética intra-populacional, indicando perda da variabilidade genética na espécie.

Com a presença do isolamento e da fragmentação populacional, a estrutura populacional é positivamente afetada, expressando a perda da variabilidade genética populacional pelo aumento de endocruzamentos (HABER, 2008). Como consequência desse processo, é esperado que as populações não se encontrem em equilíbrio genético e a espécie possa sofrer deriva genética (ALLENDORF et al., 2013; SILVA, 2016).

Uma forma de mensurar a estrutura genética das populações de uma determinada espécie é pela estimativa dos índices de fixação, ou estatísticas-F de Wright (WRIGHT, 1951; WRIGHT, 1965). O grau de diferenciação entre as populações (F_{ST}) expressa o grau de endogamia entre as populações de uma espécie, independente do sistema reprodutivo da espécie (WRIGHT, 1965). De acordo com os valores de F_{ST} , é possível descrever o grau de endogamia entre as populações, de forma que valores acima de 0,25 indicam grande diferenciação genética (WRIGHT, 1978). *Medicago citrina* (Font Quer) Greuter é uma planta endêmica do oeste do mediterrâneo que apresenta forte estrutura populacional expressa pelos valores médios de F_{ST} à 0,386 (JUAN et al., 2004). Segundo os autores, os valores elevados de F_{ST} indicam alto grau de isolamento interpopulacional para *M. citrina*.

O índice de endogamia intrapopulacional (F_{IS}) descreve o desvio da panmixia dentro de uma população, levando em conta o seu sistema reprodutivo (WRIGHT, 1965). Os valores de F_{IS} expressam a possibilidade de endogamia em cada população analisada, cujos valores positivos de F_{IS} indicam a presença de processos endogâmicos nas populações e valores negativos indicam que cada população está geneticamente equilibrada (PARREIRA et al., 2020). A presença de valores negativos de F_{IS} expõem o menor número de heterozigotos na população e a presença de alelos únicos com alta frequência (YUAN et al., 2018). Logo, os valores de F_{IS} inferem a perda variabilidade genética de cada população amostrada e seu grau de isolamento entre as demais populações (MONTALVO & ELLSTRAND, 2001; CORDEIRO et al., 2019).

A altitude confere fatores climáticos ímpares para cada população (MELITO et al., 2016; FILATOV et al., 2016), ocasionando variações de temperatura, intensidade luminosa, presença/ausência de polinizadores e dispersores e interferindo na diversidade e na estrutura genética populacional. Sabe-se que os fatores climáticos alteram estrutura genética populacional (KHADIVI-KHUB et al., 2014; SELSELEH et al., 2019) e a altitude contribui positivamente com a estrutura genética e com a elevação da diversidade genética (LIAN et al., 2018), aumentando a habilidade das espécies a se adaptarem aos fatores climáticos locais (ZHAO et al., 2016). Logo, é necessário amostrar a diversidade populacional e a estrutura genética dessas populações com a finalidade de apontar a variabilidade presente na espécie e se diferentes fatores, como a altitude, podem contribuir com o isolamento inter e intrapopulacional.

As técnicas denominadas ômicas têm ampla aceitação na comunidade científica, produzindo materiais científicos cuja investigação se pauta na sinalização químico-molecular das plantas em momentos de estresses ambientais (DUQUE et al., 2013), na dormência de plantas (ANDERSON, 2015), no metabolismo especializado (ZHONG, 2011; WANG et al., 2015), na conservação de espécies nativas, na evolução, na dinâmica populacional, na deriva genética, na hibridização e na especiação (EMERSON et al., 2015; RUSSELLO et al., 2015).

A construção de bibliotecas GBS (*genotyping-by-sequencing*), visando a descoberta de nucleotídeos de polimorfismo único (SNP) tem por finalidade reduzir a complexidade do genoma da espécie amostrada e promover a busca por pequenas variações que não são usualmente indicadas pelo uso de outros marcadores moleculares (ELSHIRE et al., 2011; POLAND et al., 2012). A investigação de polimorfismos em múltiplos loci de interesse via exploração de SNP aumenta substancialmente a capacidade de análise e associação entre os genes e o metabolismo (EMERSON et al., 2015; RUSSELO et al., 2015; KIM et al., 2016), como também a busca pela associação da diversidade e estrutura genéticas com a altitude.

3. *Lychnophora pinaster* Mart. e regiões de origem da espécie

O gênero *Lychnophora* (Asteraceae) abriga 35 espécies, das quais 23 são encontradas em diferentes fitofisionomias do bioma Cerrado, cujas espécies apresentam ampla variação morfológica descrita pelos portes de arvoreta, arbustos e raramente subarbustos, com ramos caulinares levemente ramificados, folhas alternas sésseis, coriáceas e com inflorescências terminais (SEMIR, 2011; de ANDRADE WAGNER et al., 2014; LOEUILLE et al., 2015; LOEUILLE et al., 2019). O gênero *Lychnophora* é quimicamente complexo, com produções de substâncias químicas das vias do metil-eritritol-fosfato (MEP), mevalonato (MVA) e via do ácido chiquímico, com grande produtividade de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos oxigenados e lactonas sesquiterpênicas utilizados na medicina tradicional (SEMIR, 2011).

Lychnophora pinaster Mart. (Asteraceae) se trata de uma espécie endêmica encontrada no cerrado mineiro, cujo seu estabelecimento no ambiente é ditado pelas condições físico-químicas dos solos e pela variação da altitude das serras do estado de Minas Gerais (SEMIR, 1991; SEMIR et al., 2011; SILVA, 2013; SILVA, 2016). *L. pinaster* ocorre em campos de canga e em campos rupestres localizados na Serra da Caraça, Serra das Carrancas, Serra de Curral d'El Rey, Serra do Curral, Serra d'Itabira do Campo, Serra do Itacolimi, Serra da Lapa, Serra de Lavras Novas, Serra do Mesquita, Serra da Moeda, Serra do Palmital, Serra da Piedade, Serra do Rola Moça e entre Virgem da Lapa e Serra do Cipó e nos municípios de Barbacena, Belo Horizonte, Belo Vale, Itabirito, Betim, Biribiri, Brumadinho, Cachoeira do Campo, Campos, Caraça, Carrancas, Catas Altas, Chapada Diamantina, Cidade de Minas, Congonhas do Campo, Gandarela, Grão Mogol, Itabira, Itabirito, Itamarandiba, Itumirim, Jardim Nossa Senhora das Graças, Lavras, Lavras Novas, Lavrinha, Mariana, Miguel Burner, Nova Lima, Santa Rita, São Julião, Serra do Ouro Branco e Santa Bárbara (SEMIR, 1991; SEMIR et al., 2011; SILVA, 2016). Esse conjunto de serras pode servir como arreira geo-

gráfica natural, segregando as populações de *L. pinaster* ao longo de sua história de vida, caminhando para um histórico de fenótipos químicos distintos.

O estado de Minas Gerais é geologicamente antigo, complexo e rico, cujas formações rochosas apresentam alterações desde o período pré-cambriano até o período fanerozóico, sendo geograficamente dividido em regiões, ou macrorregiões (IBGE, 1972; ALKMIM, 2018). *L. pinaster* é encontrada na região Norte do estado, na Região metropolitana de Belo Horizonte; e na região denominada Campo das Vertentes, cujas regiões apresentam características geológicas e morfológicas distintas. A região denominada Campo das Vertentes apresenta serras formadas por rochas cristalinas geologicamente antigas, mas também por plateaus com bacias sedimentares importantes para o estabelecimento de fitofisionomias do Cerrado e da Mata Atlântica (BARUQUI et al., 2006). Segundo o autor, há variação de altitude de 400 a 1300 m na região, contribuindo para o estabelecimento de espécies endêmicas.

A Região metropolitana de Belo Horizonte abriga o Quadrilátero Ferrífero de Minas Gerais. O Quadrilátero Ferrífero apresenta relevo muito acidentado e geologicamente complexo, sendo circundado pela Serra do Curral, com altitudes médias de 1200 m; a Serra da Moeda, com altitudes médias de 1300 m; a Serra do Caçara, conjunto de fortes escarpes com altitudes superiores a 2000 m; e a Serra de Ouro Preto, com altitudes aproximadas a 1400 m (SILVA, 2006; ALKMIM, 2018; BARROS & MAGALHÃES JUNIOR, 2018).

A grande variação de altitude no Quadrilátero Ferrífero se dá pelas características litológicas e estruturais do relevo, cuja altimetria elevada ocorre em itabiritos e quartzitos, rochas com maiores resistências a erosão (SILVA, 2006). Além disso, é sabido que esses sistemas de rochas apresentam soerguimento geologicamente antigo (superior a 541Ma), mediano (fanerozóico, de 541Ma até o presente) e recente, ocorrendo nos períodos Eoceno-Oligoceno (35-33 Ma), Mioceno (16-13 Ma), Plioceno (7 Ma) e Pleistoceno (1 Ma) (ALKMIM, 2018). A intensa erosão modificou a distribuição fitofisiológica de região, contribuindo com pressões

seletivas para o estabelecimento de campos rupestres e florestas estacionais semidecíduais, formações vegetacionais do Cerrado e da Mata Alântica (SILVA, 2006; ALKMIM, 2018).

A região Norte de Minas Gerais é composta pela Serra do Espinhaço e pela Chapada Diamantina (MEYER & FRANCESCHINELLI, 2010). A composição geológica abrange rochas constituídas de quartzitos, arenitos, filitos, itabiritos e dolomitas, cujos diversos processos erosivos promoveram a formação de solos arenosos, ácidos e com baixa capacidade de retenção de água (SEMIR, 2011). A Cadeia do Espinhaço apresenta variação de altitude entre 800 e 2000 m (ECHTERNACHT et al., 2011; SEMIR, 2011) e seu auge de soerguimento ocorreu entre 900 e 620 Ma (ALKMIM, 2018). Os mares de morros encontrados no estado de Minas Gerais podem funcionar como barreiras geográficas para as espécies vegetais, contribuindo com o aparecimento de endemismos, como é o caso do gênero *Lychnophora*.

O mapeamento dos perfis químicos dos óleos essenciais de *L. pinaster* mostra que populações naturais denominadas Poço Bonito, Estrada Real e Antena de ocorrência nos Campo das Vertentes apresentaram perfil químico distinto entre elas (HABER, 2008). As populações Poço Bonito e Estrada Real apresentaram como substância majoritária o *trans*-cinamato de metila (variando de 61% a 82%) e para a população Antena o cedr-8(15)-en-9- α -ol (25,2%). Ao analisar os óleos essenciais de duas populações dos Campo das Vertentes (Carrancas-MG) e uma da Região metropolitana de Minas Gerais (Itabirito-MG), foi constatado que o *trans*-cinamato de metila é componente majoritário nas populações dos Campo das Vertentes e há ausência dessa substância na população da Região metropolitana de Belo Horizonte (SILVA, 2016). Segundo o autor, 92,7% da variação química do óleo essencial de *L. pinaster* está relacionada com a composição química do solo.

Com relação a diversidade genética de *L. pinaster*, Haber (2008), utilizando de marcadores microssatélites, registrou que as heterozigosidades observadas (H_o) foram menores que as heterozigosidades esperadas (H_e) em três populações de *L. pinaster* dos Campo das Vertentes, apontando excesso de homozigotos nas populações. A autora também observou que

não há grande variação genética entre as três populações expressa pela análise de variância molecular (AMOVA), mas a divergência gênica entre as populações é intermediária (9,43%), resultante da distância geográfica interpopulacional. Além disso, os valores de endogamia entre as populações não foram elevados. Contudo, a população de Antena apresentou elevados valores de endogamia, evidenciando que o isolamento geográfico dessa população pode contribuir com a queda no fluxo gênico entre as populações e favorecer o cruzamento entre indivíduos aparentados, diminuindo a variabilidade genética da espécie.

Silva (2016) amostrou seis populações de *L. pinaster* das regiões dos Campos das Vertentes e uma população da Região metropolitana de Belo Horizonte (Poço Bonito, Serra do Sofá, Serra da Arnica, Serra do Salto, Serra Branca, Areia Branca e Ouro Branco). O autor reporta que, dos alelos investigados nas proporções de Hardy-Weinberg, os valores de H_e foram maiores que H_o , indicando ocorrência de endogamia. Ainda segundo o autor, é necessário investigar um maior número de populações de *L. pinaster* no estado de Minas Gerais, a fim de comprovar a ação efetiva dos fatores ambientais na diversidade genética dessa espécie.

Com as informações apresentadas anteriormente, a espécie apresenta grande potencial de uso farmacológico e medicinal, cujas composições químicas dos óleos essenciais já amostradas trazem apenas uma parcela da composição química global da espécie. Além disso, a diversidade e estrutura genética de *L. pinaster* deve ser amostrada e possivelmente associada com os fatores climáticos e a altitude das serras de Minas Gerais, com a finalidade de buscar padrões químicos e genéticos da espécie os quais sirvam de gatilho para futuros estudos de conservação ambiental e biotecnologia.

Logo, é primordial examinar um maior número de populações de *L. pinaster* encontradas nas serras de Minas Gerais, fato que contribuirá com a descrição da diversidade química e genética da espécie. Diante dos resultados dos estudos anteriores, foram formuladas as seguintes perguntas: a) A altitude seria responsável por isolar as populações de *L. pinaster* ao

ponto de alterar significativamente a diversidade química e genética da espécie?; b) Há associação entre a diversidade química e genética populacional de *L. pinaster*?

De acordo com as perguntas realizadas, chegamos às seguintes hipóteses:

H₀: A altitude interfere na diversidade química e genética de *L. pinaster*; e

H₀: Há associação entre a diversidade química e genética de *L. pinaster*

VII - Considerações Finais

Com base em nossos resultados, apontamos que há grande divergência química e genética entre as populações de *L. pinaster* estudadas;

- As populações da Região metropolitana de Belo Horizonte apresentam *pools* genéticos distintos entre si, indicando que a altitude eleva a diversidade genética da espécie;
- Os óleos essenciais das folhas de *L. pinaster* representam um excelente exemplo de diversidade química sob efeito dos fatores climáticos, de forma que há seleção diferencial na produção de monoterpenos e sesquiterpenos entre as populações investigadas;
- Há evidências de seleção química na produção de sesquiterpenos oxigenados entre as populações SRM, SM, RPS, DI, ODMa e GM, mostrando que a variação de altitude, o isolamento geográfico e os fatores climáticos elevam a diversidade química dos óleos essenciais, contribuindo com estudos futuros para programas de conservação de *L. pinaster*.

VIII - Referencial Bibliográfico

- ADAMS, R.P., 2017. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Biochem. Syst. Ecol. 24, 594.
- ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G.; AITKEN, S.N. **Conservation and the genetics of populations**. John Wiley & Sons, Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, UK, 2013.
- ALEXANDER, D.H.; NOVEMBRE, J.; LANGE, K., Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. **Genome Research**, v.19(9), 2009
- ALKMIM, F.F., História Geológica de Minas Gerais, in: Pedrosa-Soares, A.C.; Voll, E.; Cunha, E.C.; **Recursos Minerais de Minas Gerais on-line**. (Eds.). História geológica de Minas Gerais, primeira ed., Belo Horizonte: Companhia de Desenvolvimento de Minas Gerais (CODEMGE), 2018, pp. 1-35.
- ANDERSON, JV (editor). **Advances in Plant Dormancy**. Springer International Publishing, Switzerland, 2015, pp. 311.
- De ANDRADE WAGNER, M., LOEUILLE, B.F.P., SINISCALCHI, C.M., MELO-DE-PINNA, G.F., PIRANI, J.R. Diversity of non-glandular trichomes in subtribe *Lychnophorinae* (Asteraceae: Vernonieae) and taxonomic implications. **Plant Systematic and Evology**, v. 300, p. 1219–1233, 2014.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COISSON, J. D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical Composition, Plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3530–3535, 2004.
- ARENA, C.; TSONEV, T.; DONEVA, D.; DE MICCO, V.; MICHELOZZI, M.; BRUNETTI, C.; CENTRITTO, M.; FINESCHI, S.; VELIKOVA, V.; LORETO, F. The effect of light quality on growth, photosynthesis, leaf anatomy and volatile isoprenoids of a monoterpene-emitting herbaceous species (*Solanum lycopersicum* L.) and an isoprene-emitting tree (*Platanus orientalis* L.). **Environmental and Experimental Botany**, v. 130, p. 22-132, 2016.

- BAKHA, M., EL MTILI, N., MACHON, N., ABOUKHALID, K., AMCHRA, F.Z., KHIRAOUI, A., GIBERNAU, M., TOMI, F., AL FAIZ, C., Intraspecific chemical variability of the essential oils of Moroccan endemic *Origanum elongatum* L. (Lamiaceae) from its whole natural habitats. **Arabian Journal of Chemistry**, v.13, p. 3070–3081, 2020.
- BARROS, L. F. P.; MAGALHÃES JUNIOR, A.P. Reconstituição de eventos geomorfológicos no Quadrilátero Ferrífero/MG a partir de registros deposicionais fluviais: a bacia do rio Paraopeba. **Quaternary and Environmental Geosciences**, v. 9, p. 36–48, 2018.
- BARUQUI, A.M.; NAIME, U.J.; MOTTA, P.E.F.; FILHO, A.C. 2006. **Levantamento de reconhecimento de média intensidade dos solos da zona Campos das Vertentes**. Dados eletrônicos – Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento/Embrapa Solos, ISSN 1678-0892; 96). Disponível em http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPS-2010/14927/1/bpd96-2006-levant_campos-vertentes.pdf.
- BITENCOURT, C.; RAPINI, A.; DAMASCENA, L.S.; JUNIOR, P.M. The worrying future of the endemic flora of a tropical mountain range under climate change. **Flora**, v. 2018, p. - 10, 2016.
- CATCHEN, J., HOHENLOHE, P.A., BASSHAM, S., AMORES, A., CRESKO, W.A. Stacks: An analysis tool set for population genomics. **Molecular Ecology**, v. 22, 3124–3140, 2013.
- CHEN, F.; THOLL, D.; BOHLMANN, J.; PICHERSKY, E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. **The Plant Journal**, v. 66, p. 212–229, 2011.
- CIRAK, C.; RADUSIENE, J.; JAKTAS, V.; IVANAUSKAS, L.; SEYIS, F.; YAYLA, F. Altitudinal changes in secondary metabolite contents of *Hypericum androsaemum* and *Hypericum polyphyllum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 70, p. 108-115, 2017.

CHAUHAN, R.S.; NAUTIYAL, M.C.; CECOTTI, R.; MELLA, M.; TAVA, A. Variation in the essential oil composition of *Angelica archangelica* from three different altitudes in Western Himalaya, India. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 401-404, 2016.

COPLOVICI, L.; KÄNNASTE, A.; PAZOUKI, L.; NINEMETS INSTITUTE, Ü. Emissions of green leaf volatiles and terpenoids from *Solanum lycopersicum* are quantitatively related to the severity of cold and heat shock treatments. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 664– 672, 2012.

CORDEIRO, E.M.G., MACRINI, C.M., SUJII, P.S., SCHWARCZ, K.D., PINHEIRO, J.B., RODRIGUES, R.R., BRANCALION, P.H.S., ZUCCHI, M.I. Diversity, genetic structure, and population genomics of the tropical tree *Centrolobium tomentosum* in remnant and restored Atlantic forests. **Conservation Genetics**, v. 20, p. 1073–1085, 2019.

CURADO, MA; OLIVEIRA, CBA; JESUS, JG; SANTOS, SC; SERAPHIN, JC, FERRI, PH. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lych-nophora ericoides*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2363-2369, 2006.

DE, A.; MUKHERJEE, S.; DEY, M. Altitudinal variation of anti-human-pathogenic- bacterial activity and antioxidative properties of darjeeling himalayan *Marchantia polymorpha* L. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 5, p. 33-42, 2015.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

DRAY, S.; DUFOUR, A.B., The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. **Journal of Statistical Software**, v. 22, p. 1–20. 2007.

DUQUE, AS; ALMEIDA, AM; SILVA, AB; SILVA, JM; FARINHA, AP; SANTOS, D; FEVEREIRO, P; ARAÚJO, SS. **Abiotic stress responses in plants: unraveling the complexity of genes and networks to survive, em abiotic stress - Plant Responses and Applications in Agriculture**, Vahdati, K; Leslie, C (Editores). Editora InTech, ISBN 978-953-51-1024-8, 2013, pp. 418.

ECHTERNACHT, L.; TROVÓ, M.; OLIVEIRA, C.T.; PIRANI, J.R. Areas of endemismo in the Espinhaço range in Minas Gerais, Brazil. **Flora**, v. 206, p. 782-791, 2011.

ELSHIRE, R.J.; GLAUBITZ, J.C.; SUN, Q.; POLAND, J.A.; KAWAMOTO, K.; BUCKLER, E.S.; MITCHELL, S.E. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. **Plos One**, v. 6(5), e19379.

EMERSON, KJ; CONN, JE; BERGO, ES; RANDEL, MA; SALLUM, MAM. Brazilian *Anopheles darlingi* Root (Diptera: *Culicidae*) clusters by major biogeographical region. **Plos One**, v. 10(7): e0130773. DOI:10.1371/journal.pone.0130773, 2015.

FILATOV, D.A.; OSBORNE, O.G.; PAPADOPULOS, A.S.T. Demographic history of speciation in a *Senecio* altitudinal hybrid zone on Mt. Etna. **Molecular Ecology**, 25:2467–2481, 2016.

FISCHER, M.C., FOLL, M., EXCOFFIER, L., HECKEL, G. Enhanced AFLP genome scans detect local adaptation in high-altitude populations of a small rodent (*Microtus arvalis*). **Molecular Ecology**, v. 20, p. 1450–1462, 2011.

FOLL, M., GAGGIOTTI, O. A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: A Bayesian perspective. **Genetics** v. 180, p. 977–993, 2008.

GANZERA, M.; GUGGENHEBERGER, M.; STUPPNER, H.Ç ZIDORN, C. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Matricaria chamomilla* cv. BONA. **Planta Medica**, v. 74, p. 453-457, 2008.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; SEGARRA-MORAGUES, J.G.; WIDMER, A.; ESCUDERO, A.; IRIONDO, J.M.; Unravelling genetics at the top: Mountain islands or isolated belts? **Annals of Botany**, v. 110, p. 1221–1232, 2012.

GU, Z., EILS, R., SCHLESNER, M., Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics** v. 32, p. 2847–2849, 2016.

- GÜNTHER, T., LAMPEI, C., BARILAR, I., SCHMID, K.J. Genomic and phenotypic differentiation of *Arabidopsis thaliana* along altitudinal gradients in the North Italian Alps. **Molecular Ecology**, v. 25, p. 3574–3592, 2016.
- GUO, B., LU, D., LIAO, W.B., MERILÄ, J. Genomewide scan for adaptive differentiation along altitudinal gradient in the Andrew's toad *Bufo andrewsi*. **Molecular Ecology**, 25, 3884–3900, 2016.
- HABER, L. L. **Caracterização da diversidade genética, via marcador microsatélite, e constituintes do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart.** 151 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2008
- HARRIS, I., OSBORN, T.J., JONES, P., LISTER, D. Version 4 of the CRU TS monthly high-resolution gridded multivariate climate dataset. **Scientific Data**, v. 7, p. 1–18, 2020.
- HIJMANS, R.J. raster: Geographic Data Analysis and Modeling. R package version 3.4-5. <https://CRAN.R-project.org/package=raster>, 2020.
- IBGE, 1972. **Carta Geológica do Brasil ao Milionésimo**. Ministério do Planejamento e Coordenação Geral, Instituto Brasileiro de Geografia, Brasília.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). Aromatic natural rawmaterials: Vocabulary. ISO 9235, Genebra, 2013, 8 p.
- JUAN, A., CRESPO, M.B., COWAN, R.S., LEXER, C., FAY, M.F. Patterns of variability and gene flow in *Medicago citrina*, an endangered endemic of islands in the western Mediterranean, as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Molecular Ecology**, v. 13, p. 2679–2690, 2004.
- KASSAMBARA, A., MUNDT, F. factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7, 2020.

- KHADIVI-KHUB A, KARIMI E, HADIAN J. Population genetic structure and trait associations in forest savory using molecular, morphological and phytochemical markers. **Gene** v. 546(2), p. 297-308, 2014.
- KIM, C; GUO, H; KONG, W; CHANDNANI, R; SHUANG, L-S; PATERSON, AH. Application of genotyping by sequencing technology to a variety of crop breeding programs. **Plant Science**, v. 242, p. 14-22, 2016.
- KÖRNER, C. **Alpine plant life. Functional plant ecology of high mountain ecosystems.** Springer, Berlin, 1999.
- LÊ, S., JOSSE, J., HUSSON, F. FactoMineR: An R package for multivariate analysis. **Journal of Statistic Software**, v. 25, p. 1–18, 2008.
- LI, X.; ZHANG, S.; YANG, Z.; SONG, K.; YI, T. Conservation genetics and population diversity of *Erigeron breviscapus* (Asteraceae), an important Chinese herb. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 49, p. 156-166, 2013.
- LIAN, T., LI, D., TAN, X., CHE, T., XU, Z., FAN, X., WU, N., ZHANG, L., GAUR, U., SUN, B., YANG, M. Genetic diversity and natural selection in wild fruit flies revealed by whole-genome resequencing. **Genomics**, v. 110, p. 304–309, 2018.
- LOBO, R.; PRABHU, K. S.; SHIRWAIKAR, A. & SHIRWAIKAR, A. *C. zedoaria* (White turmeric): a review of its chemical pharmacological and ethnomedicinal properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 13-21, 2009.
- LOEUILLE, B., SEMIR, J., LOHMANN, L.G., PIRANI, J.R. A phylogenetic analysis of *Lychnophorinae* (asteraceae: Vernonieae) based on molecular and morphological data. **Systematic Botany**, v. 40, p. 299–315, 2015.
- LOEUILLE, B., SEMIR, J., PIRANI, J.R., 2019. A synopsis of *Lychnophorinae* (Asteraceae: Vernonieae), **Phytotaxa**. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.398.1.1>
- LORETO, F., SCHNITZLER, J.-P. Abiotic stresses and induced BVOCs. **Trends in Plant Science**, v. 15, p. 154–166, 2010.

- LUU, K., BAZIN, E., BLUM, M.G.B., pcadapt: an R package to perform genome scans for selection based on principal component analysis. **Molecular Ecology Resources**, v. 17, p. 67–77, 2017.
- MARQUES, A.P.S., BONFIM, F.P.G., SANTOS, D.G.P.O., LIMA, M. DA P., SEMIR, J., MARTINS, E.R., ZUCCHI, M.I., HANTAO, L.W., SAWAYA, A.C.H.F., MARQUES, M.O.M. Chemical diversity of essential oils from the Brazilian medicinal plant *Lychnophora pinaster* Mart from different environments. **Industrial Crops and Products**, v. 156, 112856, 2020.
- MEENA, B.; TIWARI, V.; SINGH, N.; MAHAR, K. S.; SHARMA, Y. K.; RAN, T. S. Estimation of genetic variability and population structure in *Ephedra gerardiana* Wall. ex Stapf (Ephedraceae): An endangered and endemic high altitude medicinal plant. **Agri Gene**, v 1, p. 116–125, 2016.
- MELITO, S.; PETRETTO, G.I.; PODANI, J.; FODDAI, M.; MALDINI, M.; CHESSA, M.; PINTORE, G. Altitude and climate influence *Helichrysum italicum* subsp. microphyllum essential oils composition. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 242-250, 2016.
- MEIRMANS, P. G. **Hardy–Weinberg Equilibrium**. Encyclopedia of Ecology, 118–126, 2019.
- MEYER, S.T.; FRANCESCHINELLI, E.V. Estudo florístico de plantas vasculares associadas às áreas úmidas na Cadeia do Espinhaço (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 4, p. 677-691, 2010.
- MONTALVO, A.M., ELLSTRAND, N.C. Nonlocal transplantation and outbreeding depression in the subshrub *Lotus scoparius* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, p. 258–269, 2001.
- MOUSTAFA, M.F., HESHAM, A.E.L., QURAISHI, M.S., ALRUMMAN, S.A. Variations in genetic and chemical constituents of *Ziziphus spina-christi* L. populations grown at various altitudinal zonation up to 2227 m height. **J. Genet. Eng. Biotechnol.** v. 14, p. 349–362, 2016

MOFIKOYA, A. O.; YLI-PIRILÄ, P.; KIVIMÄENPÄÄ, M.; A, BLANDE, J. D.; VIRTANEN, A.; HOLOPAINEN, J. K. Deposition of α -pinene oxidation products on plant surfaces affects plant VOC emission and herbivore feeding and oviposition. **Environmental Pollution**, v. 263, p.114437, 2020.

MONTEIRO, L.; MACHADO, N.; MARTINS, E.; POUGY, N.; VERDI, M.; MARTINELLI, G.; LOYOLA R. Conservation priorities for the threatened flora of mountaintop grasslands in Brazil. **Flora**, 2017.

PARREIRA, B., QUÉMÉRÉ, E., VANPÉ, C. et al. Genetic consequences of social structure in the golden-crowned sifaka. **Heredity**, v. 125, p. 328–339, 2020.

POLAND, J.; BROWN, P.J.; SORRELLS, M.E.; JANNINK, J.C. 2012. Development of high-density genetic maps for Barley and Wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. **PLoS One**, v. 7(2): e32253.

PORTELLA, R. O. ; MARQUES, M. O. M.; FACANALI, R.; ALMEIDA, L. F. R. Diferentes níveis de luminosidade determinam o perfil fitoquímico de plântulas de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Trends in Bioscience & Biotechnology**, v. 1, p. 13-15, 2014.

PRITCHARD, R.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, v. 155, p. 945–959, 2000.

REIS, É.S., PINTO, J.E.B.R., BERTOLUCCI, S.K. V, CORRÊA, R.M., PAULA, J.R., ANDRADE, S.T., FERRI, P.H., Seasonal Variation in Essential Oils of *Lychnophora*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 2008–2011, 2010.

REN, J., SUN, DAOKUN, CHEN, L., YOU, F.M., WANG, J., PENG, Y., NEVO, E., SUN, DONGFA, LUO, M.-C., PENG, J. Genetic diversity revealed by single nucleotide polymorphism markers in a worldwide germplasm collection of durum wheat. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 7061–7088, 2018.

ROSENMAI, P. Calculating a distance matrix for geographic points using R. 30 de janeiro de 2014. Disponível em: <https://eurekastatistics.com/calculating-a-distance-matrix-for-geographic-points-using-r/>. Acesso em: 25/11/2019.

RUSSELLO, M.A.; WATERHOUSE, M.D.; ETTER, P.D.; JOHNSON, E.A. From promise to practice: pairing non-invasive sampling with genomics in conservation. **Peer Journal**, v. 21, e1106, 201.

SÁNCHEZ, C. F. B. **Diversidade entre e dentro de populações simuladas sob deriva genética** (Dissertação). Universidade Federal de Viçosa- UFV, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Magister Scientiae, 2008.

SELSELEH M, HADIAN J, EBRAHIMI SN, SONBOLI A, GEORGIEV MI, MIRIJALILI MH. Metabolic diversity and genetic association between wild populations of *Verbascum songaricum* (Scrophulariaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 137(1), p. 112-125, 2019/

SEMIR, J. **Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaceae: Compositae)**. 1991. 515 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade de Campinas, Campinas. 1991.

SEMIR, J; REZENDE, AR; MONGE, M; LOPES, NP. **As arnicas endêmicas do Brasil: uma visão sobre a biologia e a química das espécies de *Lychnophora* (Asteraceae)**. Editora UFOP, 2011, pp. 211.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V.; Oleos volateis. In: SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO., J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianopolis: Editora da UFSC, 2007, 467-496.

SINGH, G.; SINGH, O. P. & MAURYA, S. Chemical and biocidal investigation on essential oils of same indian *Curcuma* species. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, pp. 75-81, 2002.

- SILVA, RMS. **Diversidade Genética de duas espécies de *Chamaecrista* com diferentes amplitudes de distribuição ao longo da Cadeia do Espinhaço.** Dissertação de Mestrado, UFMG, 2006.
- SILVA, PSS. **Caracterização da composição química dos óleos essenciais de *Lychnophora pinaster* Mart. em função da sazonalidade.** Dissertação de Mestrado, FCA/UNESP, 2013.
- SILVA, PSS. **Caracterização da diversidade genética e composição química de *Lychnophora pinaster* Mart.** Tese de Doutorado, FCA/UNESP, 2016.
- SORO, L.C.; MUNIER, S.; PELISSIER, Y.; GROSMARE, L.; YADA, R.; KITTS, D.; ATCHIBRI, ALO-A.; GUZMAN, C.; BOUBARD, F.; MENUT, C.; ROBINSON, J. C.; POUCHERET, P. Influence of geography, seasons and pedology on chemical composition and anti-inflammatory activities of essential oils from *Lippia multiflora* Mold leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194(24), p. 587-594, 2016.
- SOUZA, G. M.; LÜTTGE, U. **Stability as a Phenomenon Emergent from Plasticity–Complexity–Diversity in Eco-physiology**; in LÜTTGE, U.; BEYSCHLAG, W. (eds.), *Progress in Botany*, Progress in Botany 76, Springer International Publishing Switzerland, 2015, pp. 211-239.
- SPITALER, R.; WINKLER, A.; LINS, I.; YANAR, S.; STUPPNER, H.; ZIDORN, C. Altitudinal variation of phenolic contents in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO: a 3-year comparison. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 369-375, 2006
- VAN DEN DOOL, H., KRATZ, P.D.J.A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas–liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463–471, 1963.
- WANG, X; WANG, D; SUN, Y; YANG, Q; CHANG, L; WANG, L; MENG, X; HUANG, Q; JIN, X; TONG, Z. Comprehensive proteomics analysis of laticifer latex reveals new insights into ethylene stimulation of natural rubber production. **Scientific Reports**, 5:13778, DOI: 10.1038/srep13778, 2015.

- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323-354, 1951.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, n. 3, p. 395-420, 1965.
- WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Variability within and among populations. Chicago: The University of Chicago Press, 1978.
- YAHIA IBH, JAOUADI R, TRIMECH R, BOUSSAID M, ZAOUALI Y. Variation of chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *Mentha x rotundifolia* (L.) Huds. (*Lamiaceae*) collected from different bioclimatic areas of Tunisia. **Biochemical and Systematic Ecology**, v. 84, p. 8-16, 2019.
- YUAN X-Y, SUN Y-W, BAI X-R, DANG M, FENG X-J, ZULFIQAR S, ZHAO P. Population Structure, Genetic Diversity, and Gene Introgression of Two Closely Related Walnuts (*Juglans regia* and *J. sigillata*) in Southwestern China Revealed by EST-SSR Markers. **Forests** v. 9(10) p. 646, 2018.
- ZHANG, JING, TIAN, Y., YAN, L., ZHANG, G., WANG, X., ZENG, Y., ZHANG, JIAJIN, MA, X., TAN, Y., LONG, N., WANG, Y., MA, Y., HE, Y., XUE, Y., HAO, S., YANG, S., WANG, W., ZHANG, L., DONG, Y., CHEN, W., SHENG, J., Genome of Plant Maca (*Lepidium meyenii*) Illuminates Genomic Basis for High-Altitude Adaptation in the Central Andes. **Molecular Plant**, v. 9, p. 1066–1077, 2016.
- ZHAO, L.L., ZHANG, Y., WANG, P.C., LUO, T.Q., ZHANG, W., CHEN, J. Morphological and genetic variations of *Sophora davidii* populations originating from different altitudes in the mountains of southwestern China. *Flora Morphol. Distrib.* **Functional Ecology of Plants**, v. 224, p. 1–6. 2016.
- ZIDORN, C. Altitudinal variation of secondary metabolites in flowering heads of the Asteraceae: trends and causes. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 197-203, 2010.

ZHONG, J-J. **Plant Secondary Metabolites em Comprehensive Biotechnology**, Moo-Young, M (editor). Editora Elsevier B.V., ISBN: 978-0-08-088504-9, 2011, pp. 299-308.

ZUCCHI, M.I., CORDEIRO, E.M.G., WU, X., LAMANA, L.M., BROWN, P.J., MANJUNATHA, S., VIANA, J.P.G., OMOTO, C., PINHEIRO, J.B., CLOUGH, S.J. Population genomics of the neotropical brown stink bug, *euschistus heros*: The most important emerging insect pest to soybean in brazil. **Frontiers in Genetics** v. 10, p. 1–12, 2019.